

Роль гена екзополігалактуронази у процесах взаємодії *Klebsiella oxytoca* VN13 з коренями проростків пшениці

Г. Л. Ковтунович, О. В. Лар, Н. О. Козировська

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

Отриману інсерційним мутагенезом *in vitro* дефектну копію гена екзополігалактуронази *K. oxytoca* VN13 з повною втратою активності використано для заміщення нативного гена методом реципрокної рекомбінації. Кількісне співвідношення мутантних бактерій та бактерій дикого типу у змішаній популяції, асоційованій з рослиною, після чотирьох тижнів вегетації суттєво не змінилося. Обидва типи клітин проникали всередину коренів рослини однаково ефективно. Відсутність функціонально активного продукту *rehX*-гена не впливає на процес проникнення даних бактерій у внутрішні тканини коренів пшениці, що пов'язується з екзосубстратною специфічністю досліджуваного ферменту і не виключає участі інших пектиназ у даному процесі.

Вступ. Використання бактеріальних препаратів у рослинництві є одним з перспективних напрямків інтенсифікації сільськогосподарського виробництва, що спричинює найменше екологічне навантаження на довкілля. Найперспективнішими є біопрепарати на основі ендofітних бактерій, тобто тих, що колонізують внутрішні тканини коренів рослин [1]. З цим пов'язаний певний інтерес дослідників до вивчення механізмів взаємодії бактерій з рослинами та встановлення генетичних детермінант, що контролюють ці механізми [2—4]. Раніше нами знайдено зв'язок між рівнем експресії пектолітичних ферментів ендofітної бактерії *K. oxytoca* VN13 та її здатністю до колонізації внутрішніх тканин коренів модельних рослин [5, 6]. Клонування гена *rehX* екзополігалактуронази (ЕС 3.2.1.82) цієї бактерії [7] надало можливість для ґрунтового вивчення впливу даного ферменту на процес взаємодії з рослиною.

Матеріали і методи. *Штами і плазміди.* Трансформацію і нарощування плазмід з *ColE1*-репліконом здійснювали за допомогою штаму *Escherichia coli* JM109, з *R6K*-репліконом — штаму *E. coli* JM109 λ pir. Штам *E. coli* S17-1 λ pir (Sm^R)

використовували для мобілізації плазмід при схрещуваннях. Усі використані плазміди наведено в табл. 1.

E. coli та *K. oxytoca* вирощували при температурі 37 °С в LB антибіотиками в разі потреби (канаміцин — 100; хлорамфенікол — 30 мкг/мл). В агарове середовище (1,5 %) для вирощування *K. oxytoca* додавали рифампіцин (100 мкг/мл).

Генно-інженерні методи. Плазмідну ДНК виділяли методом лужного лізису [10]. При необхідності препарати ДНК обробляли РНКазою в концентрації 100 мкг/мл з наступним очищенням фенолом та хлороформом. Ферменти рестрикції *BamHI*, *SalI*, *EcoRI* фірми «Fermentas» (Литва), *SacI* фірми «Pharmacia Biotech» (Швеція), а також ДНК-лігазу фага T4, ДНК-полімеразу I, панкреатичну лужну фосфатазу фірми «Boehringer Mannheim» (ФРН) використовували за прописом фірм-виробників. Розчини X-gal та IPTG готували і використовували, як описано [10]. Компетентні клітини *E. coli* довготермінового зберігання готували та трансформували за методикою [11]. ДНК-ДНК гібридизацію здійснювали згідно з [10] з використанням набору реактивів для мічення та детекції ДНК фірми «Pharmacia Biotech».

Зерна пшениці сорту «Катюша» стерилізували препаратом «Білизна» (Україна) протягом 20 хв.

Таблиця 1
Плазмідні, використані в роботі

Назва плазмід	Реплікон	Фенотип або генотип	Розмір, тис. п. н.	Джерело
<i>pJP5603</i>	R6K	Km ^R	3,1	[8]
<i>pHP45Ω-Cm</i>	—	Ap ^R , Cm ^R	5,8	[9]
<i>pBluS2ΔH</i>	ColE1	Ap ^R , <i>peh</i>	6,2	[7]
<i>pBluS2::Cm</i>	ColE1	Ap ^R , Cm ^R , <i>peh</i> ⁻	10,7	Дана робота
<i>pJPpeh::Cm</i>	R6K	Km ^R , Cm ^R , <i>peh</i> ⁻	10,9	Дана робота

Відмиті 10-разово дистильованою водою зернівки інокулювали нічною культурою *K. oxytoca* VN13, розведеною фізіологічним розчином до концентрації $2 \cdot 10^8$ КУО/мл, протягом 5 хв. Корені проростків (100 мг) стерилізували з поверхні тим же препаратом протягом 5 хв і відмивали 10-разово дистилатом, гомогенізували у фаянсовій ступці в 0,9 мл фізіологічного розчину, титрували і висівали на чашки з відповідними антибіотиками.

Тест на деполімеризацію пектату здійснювали, як описано в [7].

Результати і обговорення. Від'ємну мутацію в гені *pehX* отримували інсерцією ДНК-послідовності *cat*-гена (Cm^R) в кодуєчу частину *pehX*, що містить сайт для рестриктази *EcoRI*. Для цього використовували *pBluS2ΔH* [7], у якій міститься лише один сайт *EcoRI*, та *EcoRI*-фрагмент плазміді *pHP45ΩCm* розміром 3,6 тис. п. н., що несе *cat*-ген. Лінеаризовану плазміді лігували з елюйованим фрагментом і трансформували *E. coli* JM109 (рис. 1). Отримана плазміді *pBluS2::Cm* мала розмір 10,7 тис. п. н. і містила *cat*-ген у структурній частині гена *pehX*. Нездатність штамів *E. coli* з плазміді *pBluS2::Cm* занурюватися на чашках з поліпектатним гелем підтвердила факт інактивації *pehX*.

Як вектор для доставки мутантного гена в хромосому використано плазміді-«самовбивцю» *pJP5603* з репліконом *RK6*, що потребує для реплікації допоміжного білка π і тому підтримується лише в спеціальних штамів *E. coli*, які синтезують π білок. Ця плазміді може бути ефективно мобілізована зі штаму *E. coli* S17-1 λ pir завдяки наявності в її послідовності *mob*-сайта плазміді *RP4*. *pJP5603* гідролізували рестриктазами *Sall* та *SacI*, сайти рестрикції для яких знаходяться в полілінкері, і лігували з *Sall/SacI* фрагментом плазміді *pBluS2::Cm*, що містить *pehX* ген з інсерцією (рис. 1). Лігазною сумішшю трансформували *E. coli* JM109 λ pir (рис. 2). Відбирали клони, резистентні до канаміцину та хлорамфеніколу. Проводили рестрикційний аналіз для підтвердження конструкції. Отриману плазміді *pJPpeh::Cm* розміром 10,9 тис. п. н. використовували для одержання *pehX* мутанта *K. oxytoca* VN13 *in vivo*.

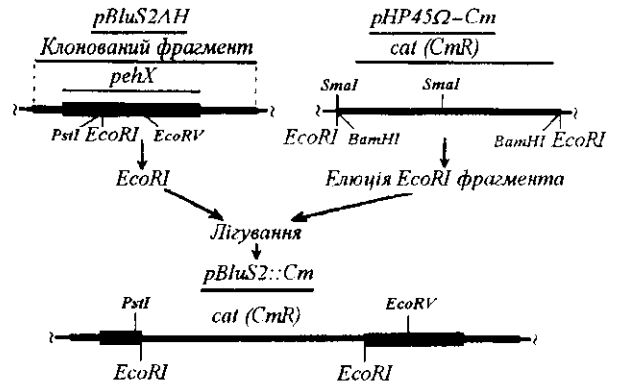


Рис. 1. Схема інактивації *pehX*-гена *in vitro* інсерцією *cat*-гена. На рисунку наведено лише фрагменти плазмід

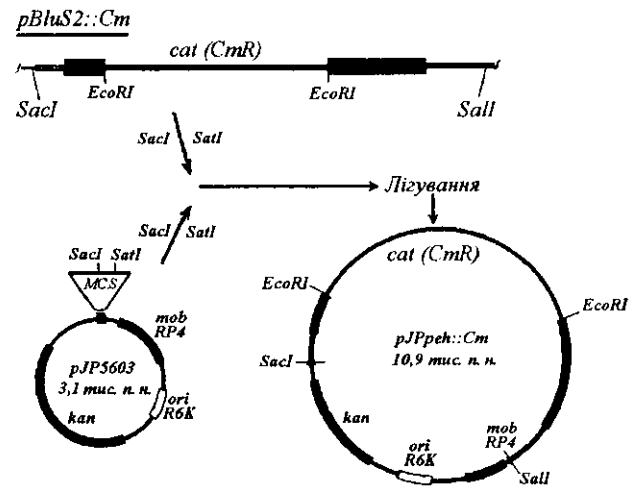


Рис. 2. Схема створення плазміді *pJPpeh::Cm* для направленої мутагенезу *pehX*-гена *in vivo* методом реципрокної рекомбінації

міді *pBluS2::Cm*, що містить *pehX* ген з інсерцією (рис. 1). Лігазною сумішшю трансформували *E. coli* JM109 λ pir (рис. 2). Відбирали клони, резистентні до канаміцину та хлорамфеніколу. Проводили рестрикційний аналіз для підтвердження конструкції. Отриману плазміді *pJPpeh::Cm* розміром 10,9 тис. п. н. використовували для одержання *pehX* мутанта *K. oxytoca* VN13 *in vivo*.

Як видно з рис. 2, *pJPpeh::Cm* несе два фрагменти *pehX*-гена, які розділені геном стійкості до хлорамфеніколу. Ці фрагменти, що мають довжину 0,9 та 2,4 тис. п. н., можуть бути залучені до гомологічної рекомбінації з відповідними ді-

лянками нативного *pehX*-гена, що знаходиться в хромосомі. Довжина цих фрагментів достатня для ефективної рекомбінації. Плазмідною *pJPpeh::Cm* трансформували мобілізуючий штам *E. coli* S17-1 λ pir для забезпечення ефективного переносу плазмиди в *K. oxytoca* VN13, у якій даний реплікон не підтримується.

В результаті схрещування отримали 140 клонів *K. oxytoca* VN13, які набули стійкості до канаміцину та хлорамфеніколу. Загальна ефективність процесу переносу плазмиди та її інтеграції в хромосому склала $7,7 \cdot 10^{-7}$ КУО/клітину реципієн-

та. Відсутність плазмідної ДНК у перевірених методом лужного лізису клонах підтвердила внутрішньохромосомну локалізацію ДНК *pJPpeh::Cm*, що інтегрувалася завдяки гомологічній рекомбінації одного з фрагментів *pehX*-гена плазмиди та нативного *pehX*-гена хромосоми *K. oxytoca* VN13. Три з отриманих клонів культивували в рідкому середовищі без антибіотиків. Після п'яти пасажів (не менше 50 генерацій) культури розтитровували до окремих колоній на чашки з хлорамфеніколом. Серед отриманих Cm^R клонів виявлено три чутливих до канаміцину, що може свідчити про вищеплення векторної частини і інактивації *pehX*-гена.

Для перевірки даного припущення використали метод ДНК-ДНК блот-гібридизації. Тотальну ДНК Cm^R , Km^S клонів, а також клітини *K. oxytoca* VN13 дикого типу гідролізували окремо рестриктазами *SalI* та *BamHI*. Для виявлення гена стійкості до хлорамфеніколу як зонд використовували *SmaI* фрагмент плазмиди *pHP45 Ω -Cm* розміром 1,7 тис. п. н. Для ідентифікації гена *pehX* використано його *PstI/EcoRV* фрагмент розміром 1,0 тис. п. н. Гібридизація з *cat*-зондом показала, що лише один з вірогідних мутантів, а саме — № 2 має цей ген у складі свого геному (рис. 3). Інші два клони мали значно нижчий рівень стійкості до хлорамфені-

Таблиця 2

Порівняння ефективності колонізації коренів проростків пишелиці *K. oxytoca* VN13 дикого типу та *pehX*-мутантом

Корені	Відсоток клітин мутантного типу (Cm^R) від загальної кількості бактерій*		
	10 днів	21 день	28 днів
Не оброблені стерилантом	49,5	57,5	39
Оброблені стерилантом з поверхні	50	57	49

*В інокуляті містилося 49 % мутантних клітин.

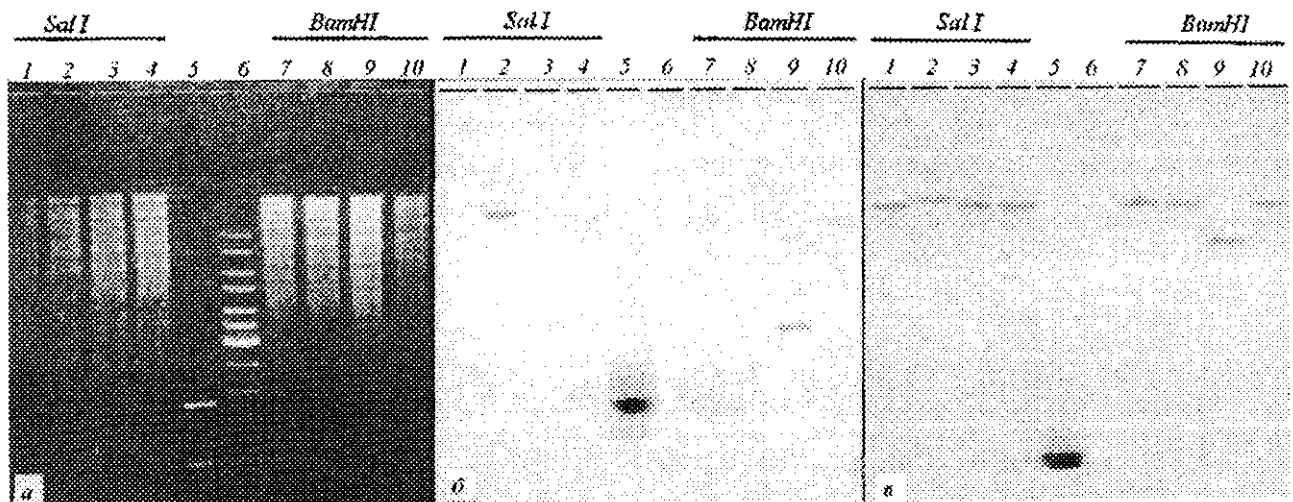


Рис. 3. Ідентифікація та підтвердження генотипу *pehX*-мутанта методом блот-гібридизації: а — агарозний гель в УФ-світлі (1—3, 8—10 — клони потенційних мутантів №№ 1—3; 4, 7 — *K. oxytoca* VN13 дикого типу; *SalI* та *BamHI* — рестриктази, якими гідролізовано хромосомні ДНК, що знаходяться на відповідних доріжках; 5 — немічені зонди для контролю гібридизації; 6 — маркер довжини ДНК-фрагментів: 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000 п. н.); б — гібридизація з *cat*-зондом (лише клон № 2 містить *cat*-ген у хромосомі); в — гібридизація з *peh*-зондом

колу, що можна пояснити спонтанними мутаціями. З даних рис. 3 випливає, що *cat*-ген у даного мутанта представлений однією копією. Гібридаційна смуга у варіанті № 2/*Bam*HI відповідає розміру вставки фрагмента *cat*-гена в *pehX*, що вищеплюється даною рестриктазою. Це остаточно підтверджує походження фрагмента, з яким згібридувався зонд. Нейлонову мембрану після відповідної обробки було повторно використано для гібридації з *pehX*-зондом. В результаті показано, що клони № 1 і № 3 не відрізняються в даному локусі від дикого типу. Гібридаційна смуга з ДНК клона № 2, розщепленої рестриктазою *Sall*, розташована вище, що відповідає більшому фрагменту через інсерцію *cat*-гена (3,4 тис. п. н.). Гібридаційна смуга у варіанті з рестриктазою *Bam*HI свідчить про те, що фрагмент, з яким гібридується зонд, значно менший у клона № 2, ніж у *K. oxytoca* VN13 дикого типу. Це пояснюється тим, що фрагмент *Bam*HI, вищеплюючи вставку з *cat*-геном, ділить фрагмент з *pehX*-геном на дві частини. З однією з них і гібридується даний зонд.

Ці дані доводять, що, по-перше, клон № 2 є неактивним мутантом за *pehX*-геном з інсерцією *cat*-гена в кодуючій частині. По-друге, згадана інсерція є єдиною індукованою нами зміною геному *K. oxytoca* VN13 і, по-третє, *K. oxytoca* VN13 має одну копію *pehX*-гена з даною нуклеотидною послідовністю в хромосомі.

Вплив мутації на взаємодію коренів проростків пшениці з рослиною. В цій роботі ми досліджували, як саме клонований ген впливає на процес взаємодії і чи буде відсутність функціонально активного продукту даного гена знижувати ефективність колонізації рослин. Для цього насіння пшениці інокулювали сумішшю клітин *K. oxytoca* VN13 мутантного та дикого типів в наближено рівних пропорціях. Фактичне співвідношення, визначене експериментально, склало 49:51. Протягом чотирьох тижнів спостерігали за співвідношенням дикого та мутантного штамів на поверхні, а також усередині коренів рослин. Дослід проводили за стерильних умов. Корінці, оброблені та не оброблені стерилантом, розтирали в ступці до гомогенного стану, розтирали та висівали на тверде середовище з рифампіцином. Мутантні бактерії розрізняли завдяки їхній стійкості до хлорамфеніколу.

Отримані результати, наведені в табл. 2, свідчать про те, що продукт клонованого гена не впливає на ефективність колонізації. Так, співвідношення загальної кількості клітин дикого і мутантного штамів після 4 тижнів вегетації суттєво не змінилося. Всередину коренів обидва типи клі-

тин проникали однаково ефективно. Природно, що в разі важливості досліджуваної пектинази для процесу проникнення всередину тканин коренів рослин співвідношення змінювалося б на користь бактерій дикого типу. З табл. 2 видно, що цього не відбувається і через 3 тижні вегетації. Відсоток клітин мутантного штаму навіть збільшився з 49 до 57,5. Поряд з цим частка мутантних клітин від загальної кількості бактерій в асоціації теж збільшилася до 57 %. Через 4 тижні відсоток мутантних клітин знижується до 49 всередині коренів і до 39 — на поверхні.

Дані щодо співвідношення клітин *K. oxytoca* VN13 дикого і мутантного типів при колонізації рослин у змішаній популяції вказують на відсутність впливу *pehX*-гена на процес взаємодії з рослинами в умовах даного дослідження. У будь-якому випадку, експресія даного гена не є критичною для цього процесу. Цей висновок повністю не спростовує припущення стосовно можливої участі пектолітичних ферментів у процесі взаємодії *K. oxytoca* VN13 з рослинами.

Екзоспецифічність даного ферменту по відношенню до субстрату теж свідчить на користь незначного впливу на щільність міжклітинних зв'язків у тканинах коренів рослин. Відомо, що у фітопатогенних бактерій роду *Erwinia*, де пектиназна активність є основним фактором патогенності, екзополігалактуроназа, як і екзопектатліаза, не спричинюють мацерації рослинних тканин [12, 13]. Отримані нами результати звучать коло пошуків факторів взаємодії серед інших наявних у досліджуваному мікроорганізмі пектиназ.

G. L. Kovtunovych, O. V. Lar, N. O. Kozzyrovska

Role of the exopolygalacturonase gene in interaction of *Klebsiella oxytoca* VN13 with wheat roots

Summary

An insertionally inactivated copy of the exopolygalacturonase (*pehX*) gene of *K. oxytoca* VN13 was used for the wild type gene substitution by reciprocal recombination. The ratio of the mutant and wild type bacterial cells in plant associated population has not been changed within a 4 week-period of the plant vegetation. Both types of cells penetrated inside the roots equally. Inactivation of the *pehX*-gene is not essential for the wheat root internal colonization, and this may be connected with substrate exospecificity of the enzyme and does not exclude a role of other pectinases in the penetrating process.

Г. Л. Ковтунович, О. В. Лар, Н. А. Козировская

Роль гена екзополігалактуронази во взаємодії *Klebsiella oxytoca* VN13 с корнями проростков пшениці

Резюме

Полученная инсерционным мутагенезом *in vitro* дефектная

копия гена экзополигалактуроназы *K. oxytoca* VN13 с полной потерей активности использована для замещения нативного гена методом реципрокной рекомбинации. Количественное соотношение мутантных и бактерий дикого типа в смешанной популяции, ассоциированной с растением, практически не изменялось в течение 4 недель вегетации растений. Оба типа клеток проникали внутрь корней растения одинаково. Отсутствие функционально активного продукта *pehX*-гена не влияет на процесс проникновения данных бактерий во внутренние ткани корней пшеницы, что может быть связано с экзосубстратной специфичностью исследуемого фермента и не исключает участия других пектиназ в данном процессе.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Hallmann J., Quadt-Hallmann, Manaffee, Kloepper J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops // Can. J. Microbiol.—1997.—43.—P. 895—914.
2. Reinhold-Hurek B., Hurek T., Claeysens M., van Montagu M. Cloning, expression in *Escherichia coli*, and characterization of cellulolytic enzymes of *Azoarcus* sp., a root-invading diazotroph // J. Bacteriol.—1993.—175.—P. 7056—7065.
3. Quandt-Hallmann A., Kloepper J. W. Immunological detection and localization of the cotton endophyte *Enterobacter asburiae* JM22 in different plant species // Can. J. Microbiol.—1996.—42.—P. 1144—1154.
4. Hazlewood G. P., Gilbert H. J. Structure and function analysis of *Pseudomonas* plant cell wall hydrolases // Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.—1998.—61.—P. 211—241.
5. Kovtunovych G. L., Kordyum V. A., Kleiner D., Kozyrovska N. O. Enhancing the internal plant colonization rate with endophytic nitrogen-fixing bacteria // Биополимеры и клетка.—1999.—15, № 4.—P. 300—306.
6. Kovtunovych G., Lar O., Kamalova S., Kordyum V., Kleiner D., Kozyrovska N. Correlation between pectate lyase activity and ability to penetrate into plant tissues by diazotrophic *Klebsiella oxytoca* VN 13 // Plant and Soil.—1999.—260.—P. 1—6.
7. Ковтунович Г. Л., Лар О. В., Козировська Н. О. Клонировання та структурний аналіз *peh*-гена *Klebsiella oxytoca* VN13 // Биополимеры и клетка.—2000.—16, № 5.—С. 356—362.
8. Penford R. J., Pemberton J. M. An improved suicide vector for construction of chromosomal insertion mutations in bacteria // Gene.—1992.—118.—С. 145—146.
9. Fellay R., Frey J., Krish H. Interposon mutagenesis of soil and water bacteria: a family of DNA fragments designed for *in vitro* insertional mutagenesis of Gram-negative bacteria // Gene.—1987.—52.—P. 147—154.
10. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual.—New York: Cold Spring Harbor Lab. press, 1989.
11. Nishimura A., Morita M., Sugino Y. A. Rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells // Nucl. Acids Res.—1990.—18.—P. 6169.
12. He S. Y., Colmer A. Molecular cloning, nucleotide sequence, and marker exchange mutagenesis of the exo-poly-alpha-D-polygalacturonosidase-encoding *pehX* gene of *Erwinia chrysanthemi* EC16 // J. Bacteriol.—1990.—172.—P. 4988—4995.
13. Brooks A. D., He S. Y., Gold S., Keen N. T., Colmer A. Molecular cloning of the structural gene for exopolygalacturonate lyase from *Erwinia chrysanthemi* EC16 and characterization of the enzyme product // J. Bacteriol.—1990.—172.—P. 6950—6958.

УДК 577.113.5

Надійшла до редакції 29.06.2000